

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

Infecção Congénita por Citomegalovírus: Importância da Prevenção e Diagnóstico Precoce

Sara Catarina Gonçalves Sousa

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

Infecção congénita por Citomegalovírus: Importância da Prevenção e Diagnóstico Precoce

Sara Catarina Gonçalves Sousa

Orientado por:

Dr. Marco Simão

MAIO'2018

Resumo

O vírus Citomegalovírus (CMV) é a principal causa de infecção congénita a nível mundial, afectando cerca de 0,6 a 0,7% dos recém-nascidos, nos países desenvolvidos. A prevalência estimada em Portugal é de cerca de 1,05%.

A infecção congénita por CMV é a principal causa não genética de surdez neurossensorial infantil e uma importante causa de atraso neurocomportamental. O espectro clínico da infecção congénita à nascença pode variar desde infecção assintomática até doença multiorgânica potencialmente fatal.

Contudo, cerca de 10 a 15% dos recém-nascidos assintomáticos desenvolverão sequelas a longo prazo, sendo a surdez neurossensorial a sequela mais frequente. A surdez associada ao CMV apresenta grande morbilidade e peso em termos de saúde pública, sendo responsável por 25% dos casos de surdez em crianças de 4 anos.

Nesta revisão serão destacados os avanços recentes em termos preventivos e diagnósticos e as estratégias actuais para diminuir o impacto associado à infecção congénita por citomegalovírus, que incluem: prevenção da infecção materna, prevenção da transmissão vertical, diagnóstico pré-natal e diagnóstico e rastreio neonatal.

Palavras-chave: *citomegalovírus congénito, surdez, prevenção da surdez, rastreio neonatal, diagnóstico*

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

Abstract

The cytomegalovirus (CMV) is the most frequent cause of congenital infection worldwide, occurring in 0.6 to 0.7% of all live births, in developed countries. The estimated prevalence in Portugal is about 1.05%.

Congenital CMV infection is the most frequent non-genetic cause of sensorineural hearing loss and a major cause of developmental delay. The congenital infection clinical spectrum at birth can range from asymptomatic to potentially life-threatening disseminated disease.

However, about 10 to 15% of asymptomatic newborns will develop long-term sequelae, being sensorineural hearing loss the most frequent one. CMV-associated deafness exhibits great morbidity and has a substantial impact in public health. It is estimated that almost 25% of deafness cases in children aged 4 is attributable to congenital CMV.

This review highlights recent advances in prevention and diagnosis and actual strategies to reduce the burden of congenital cytomegalovirus infection, including: prevention of maternal infection, prevention of mother-to-child transmission, prenatal diagnosis, neonatal diagnosis and screening.

Keywords: *congenital cytomegalovirus, hearing loss, hearing loss prevention, neonatal screening, diagnosis*

Índice

Introdução	5
1. Virologia e Epidemiologia	6
2. Manifestações clínicas	7
3. Prevenção da infecção materna	10
4. Diagnóstico e Rastreio na gravidez	11
5. Prevenção da transmissão vertical	13
6. Diagnóstico pré-natal	14
7. Diagnóstico neonatal	15
8. Rastreio neonatal	17
8.1 Rastreio auditivo neonatal	17
8.2 Rastreio universal	18
8.3 Rastreio dirigido	19
Conclusão	21
Agradecimentos	22
Bibliografia	23
Anexos	28

Introdução

O vírus Citomegalovírus (CMV) é o principal agente de infecção congénita, apresentando uma incidência de 0,6-0,7% a nível mundial. (1)

Em termos de Saúde Pública, a infecção congénita por citomegalovírus tem um peso substancial, na medida em que é a principal causa não genética de surdez neurossensorial e a causa viral mais frequente de atraso mental. (1) Deste modo, a infecção congénita está associada a elevados custos económicos, sendo o custo anual estimado, nos Estados Unidos da América em 1992, cerca de 2 biliões de dólares. (2)

Apesar da grande morbilidade associada à infecção congénita por citomegalovírus, esta é frequentemente subdiagnosticada. Tal facto deve-se à ausência de sintomatologia, quer na maioria das grávidas que adquirem a infecção primária, quer na maioria dos recém-nascidos infectados. Para além disso, existem outros factores que contribuem para a elevada morbilidade da infecção: a ausência de programas de rastreio universais bem definidos, que permitam um diagnóstico precoce, quer em termos pré-natais, quer em termos neonatais; uma limitada consciencialização por parte dos clínicos e população geral sobre a infecção, que se reflecte no desconhecimento das medidas preventivas que minimizam o risco de infecção na grávida; tratamentos com eficácia e toxicidade limitadas; e ausência de vacinação eficaz. (3)

Contudo, com o surgimento de evidência recente acerca da disponibilidade de novos métodos diagnósticos mais eficientes e terapêuticas precoces cada vez mais eficazes e seguras, tem surgido necessidade de se discutir esta problemática, para implementação de novas recomendações clínicas e programas de rastreio. (3)

O objectivo desta revisão é realçar a importância da infecção congénita pelo citomegalovírus e o seu impacto na surdez neurossensorial, destacando os avanços em termos preventivos e diagnósticos e a importância da prevenção e diagnóstico precoce como principais armas para diminuir a morbilidade associada à doença.

1. Virologia e Epidemiologia

O citomegalovírus (CMV) é um vírus de DNA pertencente à família *herpesviridae*, subfamília *Betaherpesviridae*, género *Cytomegalovirus*, sendo reconhecido como a espécie Human herpesvirus 5, deste modo também pode ser denominado HHV-5. O CMV tem a capacidade de infectar *in vivo* um grande número de células, entre as quais se incluem fibroblastos, macrófagos, células epiteliais, endoteliais e musculares. (4) O CMV tem a capacidade de ficar latente após a infecção primária. Posteriormente, o hospedeiro poderá sofrer uma reactivação com a mesma estirpe ou adquirir uma nova infecção com outra estirpe, isto é, reinfeção. (5)

Relativamente às formas de transmissão, estas ocorrem através de fluidos corporais e podem ser horizontais ou verticais. Se a transmissão ocorrer durante a gravidez, estamos perante uma infecção congénita, e se ocorrer durante o parto ou amamentação trata-se de uma infecção perinatal. Nos adultos ou crianças mais velhas, a forma mais frequente de transmissão é através do contacto com urina ou saliva das crianças entre 1 e 2 anos infectadas, mas também é frequente a transmissão através de saliva de adulto ou através de via sexual. (1)

Tendo em conta a variedade das vias de transmissão, a seropositividade para o CMV em adultos é elevada, variando, contudo, entre as populações. Nos países desenvolvidos a seroprevalência em mulheres em idade fértil varia de 50 a 85%, enquanto que em países em desenvolvimento se aproxima de 100%, isto porque, a infecção é adquirida muito cedo durante a vida através da amamentação e estilo de vida. (6) Os factores associados a alta prevalência são: baixo nível socioeconómico, raça não caucasiana, contacto próximo com crianças e actividade sexual. (7)

A transmissão intrauterina pode ocorrer em grávidas sem imunidade pré-existente (infecção primária) ou em grávidas com anticorpos pré-existent, tanto por reactivação como por aquisição de nova estirpe (infecção não primária). As infeções primárias estão associadas a um maior risco de infecção do feto, aproximadamente 30-35%. Enquanto nas infeções não primárias o risco é de 1,1-1,7%. (1) Contudo, devido à elevada prevalência de seropositividade em mulheres férteis, são as infeções não primárias as responsáveis por, aproximadamente, 75% das infeções congénitas por CMV. (8)

Estudos mais antigos sugeriam que crianças infectadas nascidas de mulheres com imunidade pré-existente teriam menos incidência de surdez neurosensorial e que, mesmo quando presente, esta seria menos severa. (9) Contudo, a evidência actual aponta para que

o risco de infecção sintomática, especialmente a que resulta em surdez neurossensorial, seja semelhante entre infecção primária e não primária. (3) Uma metanálise realizada em 2013 mostrou que o risco de surdez neurossensorial após uma infecção não primária era 11%, versus 13% após uma infecção primária. (10)

Deste modo, a infecção congénita por CMV é a causa mais frequente de infecção congénita a nível mundial, com uma incidência de 0,6-0,7% em todos os nascimentos, nos países desenvolvidos, e cerca de 1 a 5% nos países em desenvolvimento. (1) Em Portugal, a prevalência estimada é de 1,05%. (11)

2. Manifestações Clínicas

A grande maioria das infeções por CMV são assintomáticas ou auto-limitadas em adultos e crianças saudáveis. Contudo, em imunocomprometidos e fetos, o CMV é responsável por várias manifestações. (1)

O espectro clínico da infecção congénita pode variar desde infecção assintomática até doença disseminada potencialmente fatal, sendo que a morte ocorre em 4% dos casos. Ao nascimento, entre 85-90% dos infectados são assintomáticos e apenas 10-15% apresenta doença sintomática. (1)

As manifestações clínicas mais frequentemente encontradas no grupo sintomático são: petéquias, icterícia, hepatomegália, esplenomegália, microcefalia e outros sinais neurológicos. Alterações laboratoriais e imagiológicas incluem trombocitopenia, alterações nas transaminases, hiperbilirrubinemia direta, coriorretinite, anormalidades do sistema nervoso central e perda auditiva neurossensorial. Cerca de um terço dos doentes são prematuros. Os achados imagiológicos mais comuns nos doentes sintomáticos são calcificações intracranianas. (12) Contudo, os critérios diagnósticos de infecção sintomática variam amplamente na literatura. Por exemplo, alguns consideram baixo peso à nascença como infecção sintomática, enquanto outros não consideram. Estas diferenças nos critérios resultam numa variabilidade no que toca às incidências de infecção sintomática ou assintomática. (2) Em 2017, numa tentativa de uniformização, o ICCRG (International Congenital Cytomegalovirus Recommendation Group) publicou critérios definidores, destacados abaixo (*tabela 1*). (3)

Moderately to severely symptomatic congenital cytomegalovirus disease

- Multiple manifestations attributable to congenital cytomegalovirus infection: thrombocytopenia, petechiae, hepatomegaly, splenomegaly, intrauterine growth restriction, hepatitis (raised transaminases or bilirubin), or
- Central nervous system involvement such as microcephaly, radiographic abnormalities consistent with cytomegalovirus central nervous system disease (ventriculomegaly, intracerebral calcifications, periventricular echogenicity, cortical or cerebellar malformations), abnormal cerebrospinal fluid indices for age, chorioretinitis, sensorineural hearing loss, or the detection of cytomegalovirus DNA in cerebrospinal fluid

Mildly symptomatic congenital cytomegalovirus disease

- Might occur with one or two isolated manifestations of congenital cytomegalovirus infection that are mild and transient (eg, mild hepatomegaly or a single measurement of low platelet count or raised levels of alanine aminotransferase). These might overlap with more severe manifestations. However, the difference is that they occur in isolation

Asymptomatic congenital cytomegalovirus infection with isolated sensorineural hearing loss

- No apparent abnormalities to suggest congenital cytomegalovirus disease, but sensorineural hearing loss (≥ 21 decibels)

Asymptomatic congenital cytomegalovirus infection

- No apparent abnormalities to suggest congenital cytomegalovirus disease, and normal hearing

Tabela 1: Critérios clínicos definidores da infecção congênita por CMV (3)

Classificar a infecção em sintomática ou assintomática tem um importante valor prognóstico, visto que os doentes sintomáticos à nascença têm um maior risco de desenvolver surdez neurossensorial e sequelas neurocomportamentais. (13) O CMV é a principal causa viral de atraso neurocomportamental, com um elevado número de crianças a sofrer de alterações psicomotoras e cognitivas, aproximadamente dois terços das crianças com doença sintomática apresenta défice cognitivo. (14) Ao contrário do grupo sintomático, a maioria das crianças assintomáticas tem um desenvolvimento normal. Contudo, 10-15% dos assintomáticos apresentará sequelas a longo prazo, sendo a surdez neurossensorial a mais frequente. As alterações visuais também podem ocorrer. (15)

A surdez neurossensorial é a sequela mais frequente da infecção congénita, ocorrendo em 12,6% dos doentes com infecção congénita. (16) Em geral, 50% dos sintomáticos e 10% dos assintomáticos desenvolvem algum grau de perda auditiva. (17) É estimado que quase 25% das perdas auditivas em crianças de 4 anos sejam devidas ao CMV, como mostra a *Figura 1*. (18)

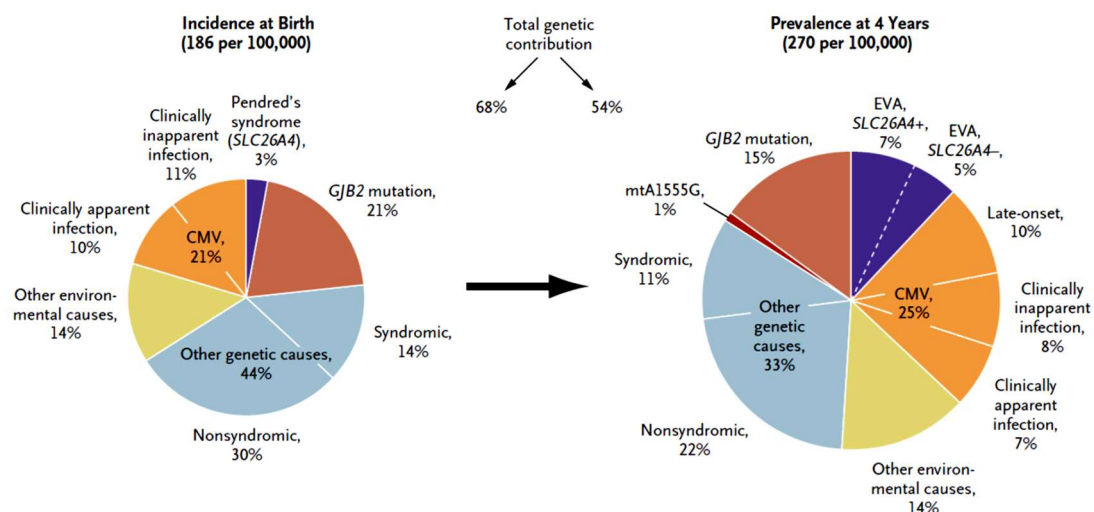


Figura 1: Incidência à nascença e prevalência aos 4 anos das diferentes causas de surdez nos Estados Unidos da América e Reino Unido. (18)

Existe uma relação entre a incidência da surdez neurosensorial e o trimestre da gravidez em que a infecção ocorre. Num estudo com 34 doentes com infecção congénita, a surdez foi detetada em 80% das crianças cuja infecção primária ocorreu no 1º trimestre, enquanto que no 2º trimestre a incidência de surdez foi de 8%. No 3º trimestre não houve nenhuma criança com surdez. (19)

A perda auditiva pode manifestar-se ao nascimento ou pode ter um início tardio. A perda auditiva com início tardio ocorre em 33-55% das infeções congénitas por CMV e, geralmente, inicia-se nos primeiros anos de vida, em média entre os 33 e os 44 meses. (20)

Num estudo prospetivo de 10 anos, com 79 doentes com infecção congénita por CMV, 5% apresentaram surdez com início tardio, em 11% foi progressiva, 16% apresentou flutuações e em 18% houve melhoria espontânea. (21) Este estudo demonstra a heterogeneidade da apresentação da surdez associada ao CMV. Uma revisão sistemática realizada em 2014, que incluiu 37 estudos, com o objectivo de definir a natureza da surdez neurosensorial associada ao CMV, concluiu que entre as crianças sintomáticas à nascença a surdez é maioritariamente bilateral (71,2%), enquanto que no grupo assintomático, a surdez é maioritariamente unilateral (57%). Em ambos os grupos a surdez foi predominantemente de severa a profunda. (16)

Aproximadamente metade das crianças terá uma deterioração ou progressão da perda auditiva durante a infância e o grau de perda pode flutuar em até 50% dos afectados. (20) O papel da latência e reactivação viral, com resposta inflamatória local, é apontado para explicar as referidas características da surdez. (13)

Deste modo, a surdez em doentes assintomáticos, bem como a sua característica de aparecimento tardio, torna a surdez extremamente difícil de avaliar em termos de impacto real na totalidade dos doentes. Não foram ainda identificados factores preditivos de mau prognóstico nos doentes assintomáticos, preditores do surgimento de uma sequela a longo prazo. (13)

3. Prevenção da infecção materna

Actualmente, a única prevenção primária possível de infecção materna é a educação da grávida acerca das possíveis fontes de exposição ao vírus e quais os comportamentos a adoptar para limitar essa exposição. Tendo em conta que a transmissão ocorre sobretudo através da saliva e urina de crianças de idade compreendida entre os 1 e os 2 anos, recomenda-se a lavagem frequente das mãos quando em contacto com crianças, particularmente após mudar fraldas, assoar o nariz ou alimentar uma criança. Outros comportamentos a evitar incluem: partilha de comida, beijos na boca ou outros comportamentos que impliquem contacto com fluidos corporais de crianças. (22)

Estudos mostraram que estas intervenções comportamentais em mulheres seronegativas foram eficazes em reduzir a seroconversão. Um estudo prospectivo, com 646 grávidas, concluiu que a seroconversão ocorreu em 1,2% do grupo das grávidas que adoptaram as intervenções comportamentais, comparativamente com 7,6% de seroconversão no grupo controlo. É concebível que limitar a exposição poderá também trazer benefícios em mulheres seropositivas. (23)

A vacinação permanece, por enquanto, apenas como uma futura possibilidade de prevenção. A natureza complexa da imunidade protetora em relação ao CMV, com a possibilidade de uma reactivação posterior e o risco de reinfeção com estirpes distintas, é um desafio na criação de uma vacina efectiva. Uma vacina ideal seria capaz de proteger mulheres seronegativas de uma infecção primária e capaz de prevenir reactivação ou reinfeção. (2)

Um estudo de fase II, com uma vacina que contém a glicoproteína B (gB) recombinante do invólucro do CMV combinada com o adjuvante MF59 (vacina gB/MF59), foi realizado em mulheres pós-parto seronegativas e mostrou uma eficácia de 50% contra a infecção primária, sendo a proteção mantida, essencialmente, nos primeiros 12 meses após a vacinação. (24) Esta vacina também foi testada em mulheres seropositivas, observando-se aumento dos anticorpos contra o CMV, mantendo-se este aumento durante 6 meses após a vacinação. Este aumento da imunidade poderá ser vantajoso na prevenção de uma infecção não primária, não havendo, contudo, confirmação sobre tal facto. (25)

Apesar destes resultados recentes, uma vacina para prevenção da infecção materna e fetal está ainda longe de ser implementada num futuro próximo. Muitos estudos, para diferentes vacinas, com diferentes alvos, estão actualmente, em vários estádios de investigação. (26)

4. Diagnóstico e Rastreio na Gravidez

O diagnóstico da infecção por CMV na grávida não pode ser feito com base apenas em sintomas ou sinais clínicos, visto que estes não são específicos. Tipicamente 25-50% das grávidas não apresentam sintomas, e quando presentes incluem, mais frequentemente, sintomas influenza-like, como febre, fadiga e cefaleia. (27) Deste modo, quando há suspeita de infecção primária por CMV na gravidez deve ser feito o diagnóstico por serologia para determinar o risco de transmissão para o feto.

Uma serologia IgM positiva e IgG negativa é um marcador recente de infecção primária, contudo, esta situação é clinicamente rara, devido ao rápido aumento da IgG e porque o teste serológico é realizado, normalmente, mais de 1 semana após a infecção primária. Deste modo, o diagnóstico de infecção materna é dado quando ocorre seroconversão, isto é, quando existe um resultado positivo de novo para IgG específica para CMV, numa grávida previamente seronegativa. Tal só será possível se houver comparação com uma serologia pré-natal ou na gravidez precoce. Na prática, o diagnóstico, através da seroconversão, não é possível na maior parte dos casos, visto não existir uma informação prévia acerca da serologia anterior à gravidez. (3)

Quando o estado pré gravidez é desconhecido, o diagnóstico deve ser feito através da avidez da IgG e da detecção de anticorpos IgM específicos, em simultâneo. O

diagnóstico é feito quando há positividade para IgM e a avidéz da IgG é baixa a moderada. A medição da avidéz é útil para distinguir uma infecção recente de uma infecção passada ou não primária. A infecção primária tem, inicialmente, baixa avidéz e quando há maturação dos anticorpos estes vão-se ligando mais fortemente aos antígenos do CMV, aumentando assim a avidéz com o tempo. Tanto uma avidéz da IgG baixa, como a determinação de uma IgM positiva, são bons indicadores para infecção primária, quando usados em simultâneo e, principalmente, após as 12-16 semanas de gestação, indicando um alto risco para infecção congénita. (28) (29) A infecção materna é classificada como não primária, se se demonstrar uma alta avidéz da IgG nas amostras iniciais da gravidez. (30)

Ao contrário de muitas outras infecções congénitas potencialmente perigosas para o feto, o rastreio pré-natal através da determinação da serologia materna para o CMV não está rotineiramente recomendado. Alguns países têm introduzido o rastreio serológico em alguns grupos de grávidas, contudo, um rastreio universal não existe. Apesar de ser a melhor forma para identificar uma infecção primária por CMV durante a gravidez, a sua implementação permanece controversa, sendo o rastreio aplicado apenas por algumas equipas obstétricas. O rastreio é dirigido apenas à detecção das infecções primárias, visto que são as responsáveis por um risco maior de transmissão fetal, para além das dificuldades inerentes à detecção das infecções não primárias. (31)

Muitos estudos têm sido realizados para identificar as grávidas seronegativas e que, portanto, têm um maior risco de seroconversão na gravidez. Os resultados desses estudos mostraram que, identificando essas mulheres seronegativas, poder-se-iam aplicar medidas preventivas primárias, como educação da grávida acerca de comportamentos de risco, de forma a diminuir o risco de infecção primária. (3) (22) Por outro lado, um diagnóstico de infecção primária materna, permite um diagnóstico precoce pré-natal da infecção no feto, que podem ajudar o clínico e o casal a tomar uma decisão, baseadas no prognóstico e nas possíveis intervenções terapêuticas possíveis, incluindo opção por terminação da gravidez. (31)

As razões para o rastreio não ser amplamente realizado na grávida são várias. A mais importante é o facto de não existirem, actualmente, intervenções terapêuticas eficazes, a oferecer à grávida com infecção primária, que diminuam o risco de transmissão ao feto e também devido ao facto de a maioria das infeções congénitas se deverem a infeções não primárias na mãe. (2)

Em Portugal, o rastreio na grávida não está recomendado devendo a serologia ser realizada apenas em contexto pré-concepcional, o que permitirá, em caso de suspeita clínica (por exemplo, síndrome gripal) ou ecográfica de infecção durante a gravidez, comparar valores laboratoriais e facilitar condutas diagnósticas. (32)

5. Prevenção da transmissão vertical

Outro nível de prevenção seria na transmissão materno-fetal. Isto é, se não se conseguir evitar a infecção materna, pode-se tentar diminuir o risco de transmissão vertical do vírus, prevenindo a infecção no feto.

A imunização passiva com gamaglobulina hiperimune anti-CMV (HIG anti-CMV) tem sido investigada como um possível meio para prevenir a transmissão para o feto, em grávidas com infecção primária por CMV.

Em 2005, um estudo não randomizado, mostrou que a administração de HIG anti-CMV, em grávidas com infecção primária, reduziu a taxa de transmissão materno-fetal de 40% para 16% e o risco de doença congénita de 50% para 3%. (33) Mais tarde, outros estudos não randomizados também mostraram eficácia da imunoglobulina, com ausência de efeitos adversos significativos, aumentando o optimismo em relação a esta estratégia. (34)

Contudo, em 2014, um estudo randomizado, de fase II, controlado por placebo, com uma amostra de 123 mulheres, mostrou que o benefício, entre as grávidas que tomaram a gamaglobulina e as que não tomaram, foi estatisticamente insignificante. Para além disso, a taxa de complicações obstétricas foi significativa. Entre as complicações ocorridas encontram-se parto pré-termo, pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal, presentes em 13% das grávidas que tomaram gamaglobulina, comparativamente a 2% das grávidas controlo. (35)

Actualmente estão a ser realizados novos estudos de fase III, randomizados, com uma amostra maior de mulheres. Por enquanto, não existem estudos que suportem o uso de gamaglobulina anti-CMV na gravidez e, por isso não está recomendada. (2)

6. Diagnóstico pré-natal

A primeira ferramenta não invasiva usada para identificação da infecção congénita suspeita é a ecografia fetal. As alterações ecográficas sugestivas de infecção podem ser inexistentes, estar ausentes precocemente, ou não serem preditivas da severidade da infecção. (36) A ressonância magnética fetal também pode ser utilizada, especialmente no diagnóstico de anormalidades neurológicas, quando a ecografia não apresenta alterações. (37) Contudo, estes métodos imagiológicos encontram-se frequentemente normais em fetos infectados e portanto são pouco úteis como métodos de rastreio. (32)

O diagnóstico pré-natal no feto pode ser feito através da análise do líquido amniótico por amniocentese, visto que o vírus é excretado para o líquido amniótico através da urina fetal. As recomendações para amniocentese incluem: uma infecção primária durante a gravidez (demonstrada por serologia) ou a presença de alterações ecográficas compatíveis com infecção por CMV. Esta deve ser realizada a partir das 20-21 semanas de gestação, quando a urina fetal está estabelecida e, pelo menos, 6 semanas desde a detecção da infecção materna. (38) Antes das 20 semanas, a sensibilidade é de apenas 45%, mas pode ser considerada em determinadas circunstâncias, particularmente quando existem questões éticas e dificuldades práticas que limitam a possibilidade de aborto após as 21 semanas. (39)

A presença do vírus pode ser detetada através de técnicas de Polymerase Chain Reaction (PCR), outras técnicas de ácidos nucleicos ou cultura do vírus. Muitos estudos mostram que ensaios por PCR em tempo real são os mais sensíveis para a detecção do vírus no líquido amniótico, apresentando uma sensibilidade de 92-98% e especificidade de 90-98%. Para aumentar ainda mais a sensibilidade pode ser feito, em simultâneo, cultura para CMV. (40) (3)

Um feto com infecção por CMV confirmada pode apresentar diversas formas de gravidade à nascença, desde assintomático até morte prematura. Vários métodos têm sido investigados para prever a gravidade e o resultado perinatal da infecção.

A quantificação da carga de CMV existente no líquido amniótico tem sido estudada como preditiva de gravidade perinatal, tendo sido sugerido que uma carga viral superior a 10^3 cópias no líquido amniótico correlaciona-se com infecção fetal e que, valores mais elevados estão associados a doença sintomática. (41) Contudo, estudos posteriores não mostraram correlação com gravidade da doença. (42)

Outros métodos têm sido investigados, incluindo: ecografia fetal, ressonância magnética fetal (43), quantificação do DNA no líquido amniótico ou sangue fetal, contagem plaquetária no sangue fetal e níveis de IgM no sangue fetal. Apesar de alguns destes métodos já estarem disponíveis carecem de verificação da sua eficácia clínica em estudos de maiores dimensões. (44) (3) (37)

7. Diagnóstico Neonatal

Existem vários métodos de diagnóstico da infecção congénita por CMV, através de amostras obtidas nos primeiros dias de vida. O diagnóstico deve ser realizado nas primeiras três semanas de vida, de forma a garantir que a infecção foi adquirida antes do nascimento.

Tradicionalmente, desde grandes estudos epidemiológicos nos anos 70 (45), o isolamento do vírus na urina ou na saliva através de cultura celular, tem sido o método standard utilizado no diagnóstico da infecção congénita. A especificidade desta técnica é referida como 100% (46), no entanto, a sua sensibilidade é inferior a técnicas alternativas, como a PCR (*polymerase chain reaction*). Esta técnica é intensiva em termos de custos e apresenta dificuldades técnicas, requerendo manutenção de culturas celulares, o que torna cada vez menos frequente a sua utilização. (2)

Há vários anos, a optimização da tecnologia por PCR levou a importantes avanços no que toca às possibilidades de diagnóstico. A técnica de PCR tem um custo mais baixo, é passível de automação, não sendo afectada por condições de transporte e armazenamento da amostra. Tem como principal vantagem o facto de ter uma maior sensibilidade. (47)

A possibilidade de se utilizarem os cartões do diagnóstico precoce (também denominados “Guthrie cards”, utilizados no comumente chamado “teste do pezinho”) para o diagnóstico neonatal da infecção congénita foi sugerida em alguns estudos. Estes estudos concluíram que o recurso a estes cartões com técnicas de PCR permitiu resultados com 100% de sensibilidade e 99% de especificidade. (48) (49) Em Portugal, em 2005, também foi realizado um estudo semelhante, em que se detetou DNA viral por PCR em “Guthrie cards”, em que se obteve uma sensibilidade de 93% e especificidade de 100%. (11)

Apesar dos resultados encorajadores dos estudos com detecção de DNA do CMV por PCR em cartões de diagnóstico precoce, um grande estudo publicado em 2010, revelou que este método tinha uma baixa sensibilidade, variando de 28,3% a 34,4%, mantendo-se uma alta especificidade de 99,9%. (47) Alguns estudos, todos retrospectivos ou prospectivos, mostram outras sensibilidades, sendo esta muito variável com as técnicas utilizadas. Para além disso, nem todos os recém-nascidos com infecção por CMV (sintomáticos ou não) têm virémia detetável à nascença. (50) (51)

Tendo em conta a baixa sensibilidade, o rastreio da infecção congénita por CMV por PCR no “teste do pezinho” permanece pouco útil, sendo a sua maior utilidade no diagnóstico de infecção em crianças que apresentam um início de sintomas mais tardio, em que um resultado positivo confirma o diagnóstico e um resultado negativo não descarta a possibilidade de infecção. (2)

Ao contrário das amostras obtidas através de “Guthrie cards”, as técnicas de PCR aplicadas em amostras de saliva produziram excelentes resultados, com uma sensibilidade e especificidade de 100% e 99,9%, respectivamente, quando em saliva líquida e sensibilidade 97,4% e especificidade 99,9%, quando em saliva seca. A percentagem de falsos positivos foi de 0,03%, podendo ocorrer devido a contaminação com leite materno infectado com CMV. A recolha da saliva deve ser feita mais de 1 hora após a amamentação. Deste modo, um resultado de triagem positivo deve ser confirmado nas primeiras 3 semanas, para evitar falsos positivos. (52) A excelente sensibilidade do teste e a facilidade de recolha da amostra de saliva torna este método vantajoso para rastreio nos recém-nascidos, para diagnóstico de uma infecção congénita com sintomas tardios. A urina também poderá ser utilizada como amostra, contudo, a sua difícil obtenção em recém-nascidos, torna esta amostra menos utilizada. (2)

O diagnóstico ou rastreio da infecção congénita deve ser realizado o mais precoce possível, visto que estes testes diagnósticos não distinguem uma infecção congénita de uma infecção pós-natal, que pode ocorrer durante o parto ou amamentação, em recém-nascidos com mais de 3 semanas. Deste modo, está recomendado que o diagnóstico de infecção congénita inclua PCR da saliva, urina ou ambos, o mais precoce possível, dentro das primeiras 3 semanas de vida. (3)

Perante um diagnóstico de infecção congénita num recém-nascido assintomático, é fundamental que se inicie uma monitorização audiológica apertada, visto que 10% dos assintomáticos desenvolvem surdez neurossensorial. (49)

8. Rastreio Neonatal

Apesar da morbilidade associada à infecção congénita por CMV, não só em termos clínicos, mas também a nível social e económico, a infecção passa frequentemente despercebida ao nascimento, visto que a maioria dos recém-nascidos são assintomáticos ou possuem sintomas pouco específicos. Tendo em conta tudo isto, é admissível que se considere a inclusão da infecção congénita por CMV num rastreio neonatal, para que se identifiquem os indivíduos assintomáticos, mas que possuem a doença. Deste modo, o principal objectivo da implementação de um rastreio seria a detecção precoce da surdez neurossensorial associada à infecção congénita. (49)

A surdez neurossensorial é a sequela tardia da infecção mais frequente, sendo apenas detetada no primeiro mês de vida em 30-50% dos infectados. (53) Esta poderá tornar-se evidente mais tarde, por volta dos 6 anos, altura em que as ofertas terapêuticas são escassas e o prognóstico será pior. (49) Deste modo, apenas um rastreio neonatal da infecção e um rastreio audiológico irão permitir uma detecção precoce da surdez, permitindo uma intervenção terapêutica precoce, que poderá incluir o implante coclear. É sabido que as crianças com diagnóstico precoce de surdez e intervenção precoce, desenvolvem melhor linguagem receptiva e expressiva e melhor função cognitiva, comparado com aquelas com diagnóstico tardio. Tudo isto é muito importante, na medida em que uma intervenção precoce pode significar a diferença entre uma criança com uma surdez moderada e uma surdez profunda, com grandes implicações a nível de desenvolvimento linguístico, social e cognitivo. (54)

8.1 Rastreio auditivo neonatal

Uma das formas de rastreio da surdez associada ao CMV é através de um rastreio auditivo neonatal universal. Este rastreio é já realizado em muitos países desenvolvidos, incluindo Portugal, e deteta a grande maioria dos recém-nascidos com surdez congénita, devendo ser realizado em todos os recém-nascidos até ao primeiro mês de vida. Actualmente existem dois métodos de rastreio auditivo que demonstram boa sensibilidade e especificidade: os potenciais evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC) e as otoemissões acústicas (OEA). Nas crianças com rastreio positivo deve ser iniciada a avaliação audiológica até aos 3 meses, em consulta de otorrinolaringologia. As crianças

com fatores de risco para surdez (ver *anexo 1*) devem ser avaliadas em consulta de otorrinolaringologia, semestralmente, pelo menos até aos 36 meses. (55) (56) Neste grupo inclui-se as crianças com um diagnóstico neonatal de infecção congénita por CMV, mas que não apresentam surdez neurosensorial. Deve ser realizado um acompanhamento audiológico frequente com intervalos de 6 meses até aos 5 anos, com possibilidade de monitorização mais frequente a cada 3 meses, quando os níveis de audição parecem alterar ou até a criança começar a falar. (57)

Contudo, aproximadamente 10% dos assintomáticos infectados por CMV desenvolvem surdez tardia, sendo estes que escapam ao rastreio auditivo neonatal. (16)

Uma das questões que se levanta quando se pensa em rastreio para infecção de CMV é quem rastrear. Deste modo poderemos ter rastreios universais, dirigidos a todos os recém-nascidos ou rastreios dirigidos a grupos específicos, por exemplo, rastreio apenas em filhos de mulheres positivas para IgG anti-CMV. Nos últimos anos um dos obstáculos à implementação de um programa de rastreio para a infecção congénita por CMV tem sido a falta de um teste de rastreio adequado, com alta sensibilidade e com boa relação custo-benefício. (3)

8.2 Rastreio universal

Vários estudos reportaram evidência que um rastreio para o CMV em todos os recém-nascidos poderia melhorar o prognóstico para os que apresentam doença assintomática. Dado que o rastreio nos recém-nascidos é a única forma de detectar todos os casos de infecção congénita. Deste modo, a elaboração de um rastreio universal bem definido tem sido foco de grande investigação. (3)

Não sendo possível realizar culturas em todos os recém-nascidos, devido ao elevado custo e difícil execução, a utilização de técnicas de PCR em amostras de urina ou saliva poderá simplificar a execução. (11)

Com o desenvolvimento das técnicas de PCR para diagnóstico da infecção congénita, existe potencial para a implementação de um rastreio universal para o CMV. Em 2017 foi publicado um estudo, cujo objectivo foi avaliar a utilidade da detecção de DNA viral por técnicas de PCR em “Guthrie cards”, para identificar, especificamente, crianças com surdez associada ao CMV. Um total de 100 322 crianças, nos Estados Unidos da América, foram rastreadas para a infecção congénita por CMV através de

cultura de saliva ou PCR da saliva. Num total de 391 crianças em que se confirmou a infecção congénita, 313 tinham amostras de “Guthrie cards” disponíveis. Estas crianças infectadas foram testadas à nascença e aos 4 anos para a presença de surdez neurossensorial. As amostras de “Guthrie cards” foram positivas em 46% das crianças com surdez à nascença, comparado com 27% de positividade em crianças com audição normal. Dentro das crianças com doença sintomática, o PCR das amostras de “Guthrie cards” falhou em identificar mais de metade das crianças que desenvolveram surdez. Deste modo, não é um método efectivo para identificar crianças com surdez relacionada ao CMV ou que virão a desenvolver surdez. (58) Assim sendo, este estudo mostrou não ser efectiva a inclusão do rastreio para o CMV congénito no rastreio metabólico realizado nos primeiros dias de vida, vulgarmente denominado, “teste do pezinho”. Apesar de um rastreio neonatal universal poder ser benéfico em identificar recém-nascidos assintomáticos, a implementação deste rastreio levanta algumas questões: o impacto psico-social familiar resultante do conhecimento da infecção, mesmo que esta não tenha qualquer manifestação, nem resulte em sequela; a referenciação da criança como potencial contagiante e possível discriminação; e a impossibilidade de intervir sob o ponto de vista terapêutico na altura do diagnóstico, visto que a eficácia da terapêutica antiviral em assintomáticos ainda não foi demonstrada. (59) Actualmente, devido às potenciais toxicidades associadas à terapêutica com valganciclovir apenas lactentes sintomáticos devem ser considerados para tratamento. Existe controvérsia se a presença de surdez neurossensorial isolada deva ser considerada doença sintomática, tendo em conta que o benefício da terapêutica antiviral nesse grupo não foi demonstrada. (3)

8.3 Rastreio dirigido

Diversos estados nos Estados Unidos da América propuseram um rastreio dirigido a todos os recém-nascidos que falharam o rastreio auditivo neonatal, para identificar surdez neurossensorial associada ao CMV. Contudo, resultados de um estudo multicêntrico documentaram que apenas 57% das crianças com infecção por CMV confirmada durante infância será identificada pelo rastreio dirigido. (60)

Um estudo recente mostrou que ambos os rastreios dirigido e universal para infecção congénita são custo-efectivos. (61) Um programa de rastreio definido está cada

vez mais próximo de ser implementado devido aos recentes avanços científicos, incluindo o desenvolvimento de um método rápido de detecção de CMV na saliva, a eficácia do tratamento antiviral em lactentes sintomáticos e a demonstração da custo-efetividade do rastreio. (62)

Conclusão

A infecção congénita por CMV é a principal causa infecciosa de malformações congénitas, atraso psicomotor e surdez neurossensorial. Esta doença tem um impacto relevante em termos de Saúde Pública, face aos elevados custos associados ao tratamento e apoio às crianças com sequelas e à morbilidade associada à doença.

Enquanto se aguarda por vacinas eficazes e fármacos capazes de impedir a transmissão materno-fetal da infecção, as estratégias preventivas devem basear-se em programas educativos para aumentar a consciencialização e fornecer informações precisas sobre o CMV, tanto para grávidas, como para prestadores de cuidados de saúde.

O rastreio serológico na gravidez é apenas recomendado em contexto pré-concepcional ou se suspeita de infecção materna, não sendo recomendado como rotina.

Em casos de confirmação ou suspeita, a infecção no feto pode ser confirmada através de análise do líquido amniótico por técnica de PCR, assim como avaliação por ecografia e ressonância magnética, para perceber as repercussões da infecção a nível fetal.

Apesar de nos últimos estudos terem surgido novos avanços no diagnóstico neonatal através de técnicas de PCR com alta especificidade e sensibilidade, em amostras de saliva ou urina, um programa de rastreio neonatal aplicável a grande escala, não foi ainda desenvolvido, sendo necessário novos estudos a comprovar a sua aplicabilidade. Um diagnóstico precoce da infecção congénita permite uma vigilância audiológica apertada e uma intervenção terapêutica precoce e, consequentemente, melhorar o prognóstico e diminuir a morbilidade associada à doença.

Concluindo, para além da prevenção primária, objectivo máximo que evitaria a infecção materna, só a conjugação dos rastreios pré e pós natal permitirá alguma alteração da história natural desta infecção que atinge um número significativo de crianças em todo o mundo.

Agradecimentos

A escrita de uma tese final de mestrado marca o término de uma importante etapa do meu percurso académico, substancial para a minha evolução individual, académica e como futura médica. Atingir este objectivo só foi possível através de trabalho, determinação e persistência.

Para todos aqueles que, de alguma maneira, me apoiaram durante este período, dedico estas páginas para exprimir o meu agradecimento.

Ao professor Óscar Dias, pela sua paixão, compreensão, incentivo e dedicação a todos os alunos.

Aos meus amigos, pais, irmã e namorado por nunca duvidarem de mim.

Bibliografia

1. Kenneson, A., & Cannon, M. J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Reviews in medical virology*, 17(4), 253-276.
2. Marsico, C., & Kimberlin, D. W. (2017). Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Italian journal of pediatrics*, 43(1), 38.
3. Rawlinson, W. D., Boppana, S. B., Fowler, K. B., Kimberlin, D. W., Lazzarotto, T., Alain, S., ... & Greenlee, J. (2017). Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(6), e177-e188.
4. Revello, M. G., & Gerna, G. (2004). Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology*, 29(2), 71-83.
5. Malm, G., & Engman, M. L. (2007, June). Congenital cytomegalovirus infections. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 12, No. 3, pp. 154-159). Elsevier.
6. Manicklal, S., Emery, V. C., Lazzarotto, T., Boppana, S. B., & Gupta, R. K. (2013). The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clinical microbiology reviews*, 26(1), 86-102.
7. Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in medical virology*, 20(4), 202-213.
8. Wang, C., Zhang, X., Bialek, S., & Cannon, M. J. (2011). Attribution of congenital cytomegalovirus infection to primary versus non-primary maternal infection. *Clinical infectious diseases*, 52(2), e11-e13.
9. Yamamoto, A. Y., Mussi-Pinhata, M. M., Isaac, M. D. L., AMARAL, F. R., CARVALHEIRO, C. G., ARAGON, D. C., ... & Britt, W. J. (2011). Congenital cytomegalovirus infection as a cause of sensorineural hearing loss in a highly immune population. *The Pediatric infectious disease journal*, 30(12), 1043.
10. Vries, J. J., Zwet, E. W., Dekker, F. W., Kroes, A., Verkerk, P. H., & Vossen, A. C. (2013). The apparent paradox of maternal seropositivity as a risk factor for congenital cytomegalovirus infection: a population-based prediction model. *Reviews in medical virology*, 23(4), 241-249.
11. Paixão, P., Almeida, S., Gouveia, P., Vilarinho, L., & Osório, R. V. (2009). Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Eurosurveillance*, 14(9), 19135.
12. Dreher, A. M., Arora, N., Fowler, K. B., Novak, Z., Britt, W. J., Boppana, S. B., & Ross, S. A. (2014). Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of pediatrics*, 164(4), 855-859.
13. Boppana, S. B., Ross, S. A., & Fowler, K. B. (2013). Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clinical infectious diseases*, 57(suppl_4), S178-S181.
14. Dobbie, A. M. (2017). Evaluation and management of cytomegalovirus-associated congenital hearing loss. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 25(5), 390-395.
15. Karltorp, E., Hellström, S., Lewensohn-Fuchs, I., Carlsson-Hansén, E., Carlsson, P. I., & Engman, M. L. (2012). Congenital cytomegalovirus infection—a common cause of hearing loss of unknown aetiology. *Acta paediatrica*, 101(8).

16. Goderis, J., De Leenheer, E., Smets, K., Van Hoecke, H., Keymeulen, A., & Dhooge, I. (2014). *Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. Pediatrics, 134*(5), 972-982.
17. Dollard, S. C., Grosse, S. D., & Ross, D. S. (2007). *New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. Reviews in medical virology, 17*(5), 355-363.
18. Morton, C. C., & Nance, W. E. (2006). *Newborn hearing screening—a silent revolution. New England Journal of Medicine, 354*(20), 2151-2164.
19. Foulon, I., Naessens, A., Foulon, W., Casteels, A., & Gordts, F. (2008). *Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection in relation to the maternal trimester in which the maternal primary infection occurred. Pediatrics, 122*(6), e1123-e1127.
20. Dahle, A. J., Fowler, K. B., Wright, J. D., Boppana, S. B., Britt, W. J., & Pass, R. F. (2000). *Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. Journal of the American Academy of Audiology, 11*(5).
21. Foulon, I., Naessens, A., Foulon, W., Casteels, A., & Gordts, F. (2008). *A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. The Journal of pediatrics, 153*(1), 84-88.
22. Adler, S. P., Finney, J. W., Manganello, A. M., & Best, A. M. (1996). *Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus by changing behaviors: a randomized controlled trial. The Pediatric infectious disease journal, 15*(3), 240-246.
23. Revello, M. G., Tibaldi, C., Masuelli, G., Frisina, V., Sacchi, A., Furione, M., ... & Gerna, G. (2015). *Prevention of primary cytomegalovirus infection in pregnancy. EBioMedicine, 2*(9), 1205-1210.
24. Pass, R. F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M. L., ... & Cloud, G. (2009). *Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. New England Journal of Medicine, 360*(12), 1191-1199.
25. Sabbaj, S., Pass, R. F., Pichon, S., & Goepfert, P. A. (2011). *Glycoprotein B vaccine is capable of boosting both antibody and CD4 T-cell responses to cytomegalovirus in chronically infected women. Journal of Infectious Diseases, 203*(11), 1534-1541.
26. Schleiss, M. R. (2008). *Cytomegalovirus vaccine development. Human Cytomegalovirus, 361-382.*
27. Munro, S. C., Hall, B., Whybin, L. R., Leader, L., Robertson, P., Maine, G. T., & Rawlinson, W. D. (2005). *Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. Journal of Clinical Microbiology, 43*(9), 4713-4718.
28. Lazzarotto, T., Varani, S., Spezzacatena, P., Gabrielli, L., Pradelli, P., Guerra, B., & Landini, M. P. (2000). *Maternal IgG avidity and IgM detected by blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus. Viral immunology, 13*(1), 137-141.
29. Prince, H. E., & Lapé-Nixon, M. (2014). *Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. Clinical and Vaccine Immunology, 21*(10), 1377-1384.
30. Puhakka, L., Renko, M., Helminen, M., Peltola, V., Heiskanen-Kosma, T., Lappalainen, M., ... & Saxen, H. (2017). *Primary versus non-primary maternal cytomegalovirus infection as a cause of symptomatic congenital infection—register-based study from Finland. Infectious Diseases, 49*(6), 445-453.

31. Walker, S. P., Palma-Dias, R., Wood, E. M., Shekleton, P., & Giles, M. L. (2013). Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or not to screen. *BMC pregnancy and childbirth*, 13(1), 96.
32. Tavares, M. V., Domingues, A. P., Tavares, M., Malheiro, E., Tavares, F., & Moura, P. (2011). Citomegalovírus existe lugar para o rastreio durante a gravidez. *Acta Med Port*, 24(supl 4), 1003-8.
33. Nigro, G., Adler, S. P., La Torre, R., & Best, A. M. (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *New England Journal of Medicine*, 353(13), 1350-1362.
34. Buxmann, H., Stackelberg, O. M., Schlößer, R. L., Enders, G., Gonser, M., Meyer-Wittkopf, M., ... & Enders, M. (2012). Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: a retrospective analysis.
35. Revello, M. G., Lazzarotto, T., Guerra, B., Spinillo, A., Ferrazzi, E., Kustermann, A., ... & Arossa, A. (2014). A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *New England Journal of Medicine*, 370(14), 1316-1326.
36. Benoist, G., Salomon, L. J., Jacquemard, F., Daffos, F., & Ville, Y. (2008). The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 115(7), 823-829.
37. Benoist, G., Salomon, L. J., Mohlo, M., Suarez, B., Jacquemard, F., & Ville, Y. (2008). Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 32(7), 900-905.
38. Liesnard, C., Donner, C., Brancart, F., Gosselin, F., Delforge, M. L., & Rodesch, F. (2000). Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstetrics & Gynecology*, 95(6), 881-888.
39. Donner, C., Liesnard, C., Brancart, F., & Rodesch, F. (1994). Accuracy of amniotic fluid testing before 21 weeks' gestation in prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Prenatal diagnosis*, 14(11), 1055-1059.
40. Azam, A. Z., Vial, Y., Fawer, C. L., Zufferey, J., & Hohlfeld, P. (2001). Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstetrics & Gynecology*, 97(3), 443-448.
41. Gouarin, S., Gault, E., Vabret, A., Cointe, D., Rozenberg, F., Grangeot-Keros, L., ... & Freymuth, F. (2002). Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), 1767-1772.
42. Goegebuer, T., Van Meensel, B., Beuselinck, K., Cossey, V., Van Ranst, M., Hanssens, M., & Lagrou, K. (2009). Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *Journal of clinical microbiology*, 47(3), 660-665.
43. Alarcon, A., Martinez-Biarge, M., Cabañas, F., Quero, J., & García-Alix, A. (2016). A prognostic neonatal neuroimaging scale for symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Neonatology*, 110(4), 277-285.
44. Leruez-Ville, M., Stirnemann, J., Sellier, Y., Guilleminot, T., Dejean, A., Magny, J. F., ... & Ville, Y. (2016). Feasibility of predicting the outcome of fetal infection with cytomegalovirus at the time of prenatal diagnosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 215(3), 342-e1.
45. Ahlfors, K., Ivarsson, S. A., Harris, S., Svanberg, L., Holmqvist, R., Lernmark, B., & Theander, G. (1984). Congenital cytomegalovirus infection and disease in Sweden and the relative importance of primary and secondary maternal infections: preliminary findings from a prospective study. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 16(2), 129-137.

46. Chou, S. (1990). Newer methods for diagnosis of cytomegalovirus infection. *Reviews of infectious diseases*, 12(Supplement_7), S727-S736.
47. Boppana, S. B., Ross, S. A., Novak, Z., Shimamura, M., Tolan, R. W., Palmer, A. L., ... & Britt, W. J. (2010). Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *Jama*, 303(14), 1375-138.
48. Barbi, M., Binda, S., Primache, V., Caroppo, S., Didò, P., Guidotti, P., ... & Melotti, D. (2000). Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *Journal of Clinical Virology*, 17(3), 159-165.
49. Barbi, M., Binda, S., Caroppo, S., & Primache, V. (2006). Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Journal of clinical virology*, 35(2), 206-209.
50. Kimberlin, D. W., Acosta, E. P., Sánchez, P. J., Sood, S., Agrawal, V., Homans, J., ... & Cloud, G. A. (2008). Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *The Journal of infectious diseases*, 197(6), 836-845.
51. Vauloup-Fellous, C., Ducroux, A., Couloigner, V., Marlin, S., Picone, O., Galimand, J., ... & Leruez-Ville, M. (2007). Evaluation of cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in dried blood spots: retrospective study of CMV congenital infection. *Journal of clinical microbiology*, 45(11), 3804-3806.
52. Boppana, S. B., Ross, S. A., Shimamura, M., Palmer, A. L., Ahmed, A., Michaels, M. G., ... & Chowdhury, N. (2011). Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *New England Journal of Medicine*, 364(22), 2111-2118.
53. Fowler, K. B., Dahle, A. J., Boppana, S. B., & Pass, R. F. (1999). Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed?. *The Journal of pediatrics*, 135(1), 60-64.
54. Kennedy, C. R., McCann, D. C., Campbell, M. J., Law, C. M., Mullee, M., Petrou, S., ... & Stevenson, J. (2006). Language ability after early detection of permanent childhood hearing impairment. *New England Journal of Medicine*, 354(20), 2131-2141.
55. European Consensus statement on neonatal hearing screening finalised at the European Consensus Development Conference on Neonatal Hearing Screening 15-16 May 1998, Milan, Italy. *Scand Audiol*. 1998 and 27(4):259-60.
56. 2007, Joint Committee on Infant Hearing. Year 2007 position statement: Principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. *American Academy of Pediatrics*. and 120(4):898-921.
57. Fowler, K. B. (2013). Congenital cytomegalovirus infection: audiologic outcome. *Clinical infectious diseases*, 57(suppl_4), S182-S184.
58. Ross, S. A., Ahmed, A., Palmer, A. L., Michaels, M. G., Sánchez, P. J., Stewart, A., ... & Boppana, S. B. (2017). Newborn dried blood spot polymerase chain reaction to identify infants with congenital cytomegalovirus-associated sensorineural hearing loss. *The Journal of pediatrics*, 184, 57-61.
59. Dollard, S. C., Schleiss, M. R., & Grosse, S. D. (2010). Public health and laboratory considerations regarding newborn screening for congenital cytomegalovirus. *Journal of inherited metabolic disease*, 33(2), 249-254.
60. Fowler, K. B., McCollister, F. P., Sabo, D. L., Shoup, A. G., Owen, K. E., Woodruff, J. L., ... & (2017). A targeted approach for congenital cytomegalovirus screening within newborn hearing screening. *Pediatrics*, e20162128.

61. Gantt, S., Dionne, F., Kozak, F. K., Goshen, O., Goldfarb, D. M., Park, A. H., ... & Fowler, K. (2016). Cost-effectiveness of universal and targeted newborn screening for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA pediatrics*, 170(12), 1173-1180.
62. Fowler, K. B., Boppana, S. B. (2018). Congenital cytomegalovirus infection. *Seminars in Perinatology*, S0146-0005(18)30008-9.
63. Boppana, S. B., Rivera, L. B., Fowler, K. B., Mach, M., & Britt, W. J. (2001). Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *New England Journal of Medicine*, 344(18), 1366-1371. 8.
64. Halwachs-Baumann, G., Genser, B., Danda, M., Engele, H., Rosegger, H., Fölsch, B., ... & Truschnig-Wilders, M. (2000). Screening and diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: a 5-y study. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 32(2), 137-14.

Anexos

Anexo 1: Indicadores de risco para surdez.

Recém-nascidos (do nascimento até aos 28 dias)
História familiar de deficiência auditiva congénita
Infecção congénita (sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, e herpes)
Anomalias crânio-faciais (malformações de pavilhão auricular, meato acústico externo, ausência de <i>filtrum</i> nasal, implantação baixa da raiz do cabelo)
Peso ao nascimento inferior a 1500 g
Hiperbilirrubinémia (níveis séricos indicativos de exsanguíneo-transfusão)
Medicação ototóxica por mais de 5 dias (aminoglicosídeos ou outros, associados ou não aos diuréticos de ansa)
Meningite bacteriana
Índice de Apgar de 0-4 no 1º minuto ou 0-6 no 5º minuto
Ventilação mecânica por período igual ou superior a 5 dias
Sinais ou síndromes associadas à deficiência auditiva de condução ou neurosensorial
Crianças até aos dois anos:
Preocupação/suspeita dos pais em relação ao desenvolvimento da fala, linguagem ou audição.
Meningite bacteriana e outras infecções associadas com perda auditiva neurosensorial.
Traumatismo crânio-encefálico acompanhado de perda de consciência ou fractura de crânio.
Estigmas ou sinais de síndromes associadas a perdas auditivas de condução e/ou neurosensoriais.
Medicamentos ototóxicos (incluindo, mas não limitados a agentes quimioterápicos ou aminoglicosídeos, associados ou não a diuréticos de ansa).
Otite média de repetição/persistente, com efusão por períodos de pelo menos 3 (três) meses.
Crianças que necessitam acompanhamento até os 3 anos de idade:
Alguns recém-nascidos podem passar no rastreio auditivo, mas necessitam acompanhamento periódico pois têm risco aumentado de aparecimento tardio de perda auditiva neurosensorial ou de condução.
Crianças com indicadores abaixo referidos, requerem avaliação a cada 6 (seis) meses.
Indicadores associados ao aparecimento tardio de perdas neurosensoriais:
História familiar de perda auditiva tardia na infância.
Infecções congénitas (rubéola, sífilis, herpes, citomegalovírus, toxoplasmose).
Neurofibromatose tipo II e doenças neurodegenerativas.
Indicadores associados ao aparecimento tardio de perdas de condução:
Otite média de repetição/recorrente ou persistente com derrame.
Deformidades anatómicas e outras desordens que afectam a função da trompa de Eustáquio.
Doenças neurodegenerativas.